

PROFIL BERAT MOLEKUL ENZIM PROTEASE BUAH NANAS (*Ananas comosus* L.Merr) DAN PEPAYA (*Carica papaya* L.) MENGGUNAKAN METODE SDS-PAGE

MOLECULAR WEIGHT PROFILE OF PROTEASE OF PINEAPPLE (*Ananas comosus* L.Merr) AND PAPAYA (*Carica papaya* L.) USING SDS-PAGE METHOD

Rizky Arcinthy Rachmania^{a*}, Priyo Wahyudi^b, Aniza Mutia Wardani^a, Dini Rohmatul Insani^a

^aProgram Studi Farmasi, Fakultas Farmasi dan Sains, Universitas Muhammadiyah Prof. Dr. HAMKA, Islamic Center, Jl. Delima II/IV Perumnas Klender, Jakarta Timur, 13460, Telp. (021) 8611070

^bBadan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, Gedung BPPT, Jl. MH Thamrin No. 8, Jakarta Pusat, Telp. (021) 3168200

*email: arcinthy.rizky@gmail.com

DOI : 10.20961/alchemy.v13i1.2540

Received 10 December 2016, Accepted 6 March 2017, Published online 11 March 2017

ABSTRAK

Kelompok enzim protease yaitu papain dan bromelin mampu menguraikan struktur molekul protein menjadi asam amino sangat bermanfaat dalam berbagai macam bidang terutama industri makanan dan farmasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil berat molekul enzim bromelin dari kulit buah nenas (*Ananas comosus* L. Merr) dan papain (*Carica papaya* L.) dari getah pepaya yang berbeda varietas dengan menggunakan metode SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis*). Presipitasi dilakukan dengan penambahan amonium sulfat ((NH₄)₂SO₄) 60 % dan dialisis enzim menggunakan tabung selofan dengan ukuran pori 12.000 Dalton. Selanjutnya, berat molekul larutan enzim hasil dialisis ditentukan dengan metode SDS-PAGE. Hasil analisis berat molekul enzim bromelin varietas Bogor dan Subang tidak berbeda yaitu berkisar 30,654 kDa, begitu juga dengan enzim papain varietas California dan Sukma tidak berbeda yaitu berkisar 23,485 kDa. Dapat disimpulkan varietas buah yang berbeda pada nenas dan pepaya tidak berpengaruh terhadap berat molekul enzim bromelin dan papain.

Kata kunci: bromelin, papain, protease, SDS-PAGE.

ABSTRACT

A group of protease enzymes such as papain and bromelain is able to decipher the molecular structure of the protein into amino acids which will be very useful in many fields, especially in food and pharmaceutical industries. The objective of this study to determine the molecular weight profile of enzyme bromelain from pineapple bark (*Ananas comosus* L. Merr) and papain (*Carica papaya* L.) from papaya latex with different varieties using sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) method. The precipitation was performed with ammonium sulfate ((NH₄)₂SO₄) 60 % addition and

dialyzed using a cellophane tube with a pore size of 12,000 Dalton. The molecular weight of enzyme solution were determined using SDS-PAGE. The analysis results of molecular weight of enzyme bromelain of Subang and Bogor varieties were not different and were about 30.654 kDa, as well as the molecular weight of enzyme papain and Sukma California varieties were also not different and were about 23.485 kDa. It can be concluded that the different varieties of fruit of pineapple and papaya had no effect on the molecular weight of enzyme papain and bromelain.

Keywords: bromelain, papain, protease, SDS-PAGE.

PENDAHULUAN

Golongan protein yang mengkatalis reaksi-reaksi biokimia yang terdapat dalam sel dengan konsentrasi yang sangat rendah dan dapat meningkatkan laju reaksi tanpa mengubah posisi disebut enzim (Kuchel *and* Ralston, 2006). Ditinjau dari segi kesehatan, enzim digunakan sebagai obat oral yang mempercepat penyembuhan pada sistem pencernaan yang mengalami defisiensi enzim. Enzim yang banyak berperan dalam hal ini adalah enzim protease (Rao *et al.*, 1998). Protease berperan penting dalam berbagai proses fisiologis dan patologis seperti katabolisme protein, pembekuan darah, pertumbuhan dan migrasi sel, pengaturan jaringan, dan inflamasi. (Motyan *et al.*, 2013). Enzim protease juga diterapkan secara luas dalam beberapa sektor industri dan bioteknologi. Beberapa penelitian yang menggunakan enzim protease, misanya: sintesis peptida, diagnostik dan terapi, penggunaan protease dalam kultur sel dan jaringan, dan *peptide sequencing* (Motyan *et al.*, 2013).

Protease banyak ditemukan dari berbagai sumber, diantaranya tumbuhan, hewan, dan mikroorganisme. Dari sumber tumbuhan sendiri protease dapat diisolasi dari tanaman pepaya terutama pada buahnya yang masih muda (Jisha, 2013) dan dapat juga diisolasi dari buah nanas (Herdyastuti, 2006). Bromelin dan papain termasuk ke dalam protease golongan sufrihidil. Kegunaan enzim bromelin lebih banyak digunakan untuk penjernihan bir, pengempukkan daging, dan dalam bidang farmasi dapat dimanfaatkan sebagai bahan kontrasepsi KB untuk memperjarang kehamilan (Wuryanti, 2004). Beberapa industri juga banyak yang menggunakan enzim papain antara lain: industri farmasi, industri kosmetik, tekstil dan penyamakan kulit (Nurhidayati, 2003).

Indonesia memiliki beberapa varietas tanaman nanas dan pepaya. Varietas nanas yang dibudidayakan secara luas di Indonesia yaitu varietas nanas *Cayenne* (nanas Subang) dan *Qween* (nanas Bogor) (Hadiati *and* Luh, 2008). Varietas buah papaya yang dibudidayakan yaitu varietas California dan Sukma (Sobir, 2009).

Penentuan berat molekul protein menggunakan SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis*) dinilai relatif sederhana, terjangkau dan cepat (Rath *et al.*, 2013). SDS PAGE adalah metode yang dapat diandalkan untuk menentukan berat molekul dari protein yang tidak diketahui, karena tingkat migrasi dari protein dilapisi dengan SDS berbanding terbalik dengan logaritma dari berat molekul. SDS PAGE dinilai lebih menguntungkan disebabkan karena besarnya pori gel, serta perbandingan konsentrasi akrilamida dan bis-metilen akrilamida, oleh sebab itu gel poliakrilamida dapat digunakan tidak hanya untuk pemisahan dari berbagai protein, tetapi juga untuk membandingkan berat molekulnya (Bintang, 2010). Kunci untuk menentukan berat molekul yang akurat adalah memilih kondisi pemisahan yang menghasilkan hubungan linier antara logaritma dari berat molekul dan migrasi protein (BioRad, 2011). Migrasi protein di dalam gel poliakrilamida terutama ditentukan oleh muatan molekul dan juga dipengaruhi oleh ukuran molekul (Bintang, 2010). Protein yang dipisahkan dengan SDS-PAGE dapat dikarakterisasi berdasarkan berat molekulnya dengan satuan Kilo Dalton (kDa). Satu dalton sama dengan satu hidrogen molekul (Bachrudin, 2000).

Enzim bromelin dan papain terdapat dalam semua jaringan tanaman baik dari tangkai, kulit, daun, buah, maupun batang. Pada penelitian sebelumnya, Nitsawang *et al.* (2006) mengukur berat molekul enzim papain yang diekstraksi dalam *aqueous two-phase system* dan *two-step salt precipitation* menggunakan metode SDS-PAGE menghasilkan berat molekul berkisar 23,406 kDa. Pitpreecha and Damrongsakkul (2006) mengukur berat molekul enzim papain dari getah pepaya dalam bentuk *crude enzyme* yang diekstrak dengan air dan yang diekstrak dengan *buffer* fosfat menggunakan metode SDS-PAGE, menghasilkan berat molekul yang sama yaitu berkisar 21 kDa. Enzim bromelin dari kulit buah nanas memiliki berat molekul di kisaran 30 kDa (Gautam *et al.*, 2010).

Perbedaan varietas pada buah yang memiliki kandungan enzim yang sama belum pernah diteliti apakah dengan perbedaan varietas tersebut memiliki profil berat molekul yang berbeda atau sama. Penelitian ini bertujuan mengkarakterisasi berat molekul enzim bromelin dari kulit buah nanas dan papain dari getah buah pepaya dari dua varietas yaitu varietas Subang dan Bogor untuk nanas dan California dan Sukma untuk pepaya dengan menggunakan metode SDS-PAGE.

METODE PENELITIAN

Peralatan yang digunakan yaitu neraca analitik, *blender* (Miyako), pH meter (Mettler Toledo), lemari pendingin (Sharp), *sentrifuge* (Biolion), magnetik *stirrer* (MS-H-Pro), *hotplate* (Wise Them), mikro pipet (*Transferpette*), peralatan elektroforesis gel *slab* (Peqlab), *shaker* (*Eyela Multi Shaker* MMS), alat gelas dan peralatan laboratorium standar (*Pyrex*).

Bahan yang digunakan yaitu kulit nanas varietas Bogor dan Subang, getah buah pepaya yang di dapat dari desa Sukamaju kabupaten Bogor, *buffer* fosfat pH 7, tabung selofan dengan ukuran 12.000 Dalton (Sigma), amonium sulfat ((NH₄)₂SO₄) (Merck), BaCl₂ (Merck), HCl (Merck), alkali EDTA (Na₂CO₃.C₁₀H₁₈N₂O₈). Penentuan berat molekul protein enzim menggunakan akrilamida (C₃H₅NO) (Vivantis), bis-akrilamida (C₃H₅NO) (Merck), basa Tris (Merck), SDS 10 % (C₁₂H₂₅NaO₄S) (Merck), amonium persulfat (H₈N₂O₈S₂) (Vivantis), tetrametiletilendiamin (Himedia), gliserol (C₃H₈O₃) (Vivantis), merkaptotetanol (C₂H₆OS) (Sigma), *bromofenol blue* (C₁₉H₁₀Br₄O₅S) (Himedia), glisin (C₂H₅NO₂) (Merck), *Coomassie blue* R250 (C₄₇H₅₀N₃O₇S₂⁺) (AppleChem Panreac), asam trikloro asetat (CCl₃COOH) (Merck), metanol (CH₃OH) (Merck), asam asetat glasial (CH₃COOH) (Merck), *marker* protein dengan ukuran 14,4 - 116 kDa (*Thermo Scientific*).

Isolasi dan Presipitasi Enzim Bromelin

Kulit buah nanas dari varietas Bogor dan Subang dicuci dengan akuades dan dipotong kecil-kecil, kemudian dihaluskan dengan *blender* dan ditambahkan sedikit demi sedikit *buffer* fosfat 0,1 M pH 7 (perbandingan 1:1) diambil filtratnya. Sari buah nanas kedua varietas dibiarkan selama 24 jam agar enzim mengendap. Endapan enzim dipisahkan dengan sentrifugasi menggunakan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C (Herdyastuti, 2006). Hasil dari sentrifugasi sari buah nanas akan terbentuk endapan dan supernatan, kemudian endapan dipisahkan dari supernatan. Ekstrak enzim kasar ditambahkan dengan amonium sulfat dengan kadar 60 % (Nurmala, 2012). Presipitasi enzim dibiarkan selama 24 jam pada suhu 4 °C, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit. Selanjutnya endapan didialisis untuk memisahkan molekul yang besar dari molekul yang kecil (Bintang, 2010).

Penyadapan, Isolasi dan Presipitasi Enzim Papain

Buah pepaya muda yang digunakan berumur 3 bulan. Varietas California sebanyak 9 buah dan 5 buah pepaya muda varietas Sukma. Buah pepaya muda yang dipilih

yaitu yang masih menggantung dipohon. Buah pepaya tersebut dibersihkan dengan menggunakan kain basah, buah ditoreh dengan menggunakan pisau *stainless steel* secara memanjang dari pangkal sampai ujung buah dengan kedalaman torehan 2 mm dan interval torehan 1 cm. Tetesan getah pepaya yang keluar ditampung dengan menggunakan botol kaca coklat agar tidak banyak teroksidasi sampai getah pepaya tidak menetes lagi, lalu botol ditutup rapat. Dilakukan penorehan yang sama pada buah pepaya berikutnya sampai memperoleh getah yang banyak. Getah pepaya segar yang sudah diperoleh ditimbang dengan menggunakan timbangan di atas cawan yang sudah ditara. Getah yang sudah ditimbang diberi natrium bisulfit sebanyak 0,7 % dari total berat getah segar untuk menghindari terjadinya oksidasi agar enzim yang terkandung di dalamnya lebih tahan lama, lalu getah pepaya dimasukkan ke botol coklat dan disimpan dalam termos berisi es dan dibawa ke tempat isolasi (Handayani, 2007).

Isolasi enzim papain dari getah buah pepaya varietas California dan Sukma yaitu homogenitas getah yang diperoleh dengan menambahkan pelarut *buffer* fosfat 0,1 M pH 7 dan didiamkan selama 2 jam pada suhu 4 °C (Kusumadjaja and Dewi, 2005). Selanjutnya untuk memisahkan pengotor-pengotor dari ekstrak kasar enzim, dilakukan pengendapan protein enzim dengan menambahkan amonium sulfat dengan derajat kejenuhan 60 % (Putri *et al.*, 2013; Nurmala, 2012). Penambahan amonium sulfat dilakukan sedikit demi sedikit dengan pengadukan secara hati-hati. Larutan akan menjadi keruh karena protein mengendap. Setelah semua amonium sulfat yang ditambahkan larut, biarkan sampai 24 jam pada suhu 4 °C. Setelah dibiarkan selama 24 jam, Enzim dipisahkan dengan sentrifugasi menggunakan kecepatan 4000 rpm selama 15 menit (Kusumadjaja and Dewi, 2005). Hasil dari sentrifugasi larutan enzim kasar akan terbentuk endapan dan supernatan. Endapan dipisahkan dari Supernatan. Endapan ditambahkan *buffer* fosfat 1:1 untuk menjaga kerusakan enzim. Selanjutnya endapan didialisis untuk menghilangkan kandungan garamnya (Bintang, 2010).

Dialisis Enzim Bromelin dan Papain

Membran selofan mengandung sejumlah kecil senyawa-senyawa sulfur, ion logam, dan beberapa enzim, oleh karena itu setiap tabung dididihkan selama 30 menit dalam alkali EDTA (Na_2CO_3 10 g/L, EDTA 1 mmol/L) untuk mencegah hilangnya aktivitas molekul-molekul yang didialisis. Setelah didinginkan, tabung selofan lalu dicuci dengan akuades, kemudian salah satu ujungnya diikat dengan benang rami. Tabung yang berbentuk kantung diisi dengan endapan hasil dari presipitasi yang kemudian akan didialisis, dan ujung yang

satunya diikat lagi. Dialisis paling baik dilakukan dengan tabung yang baru saja disiapkan, karena bila sudah basah, kantung akan peka terhadap serangan mikroorganisme. Jika harus disimpan, maka kantung selofan harus disimpan dalam larutan yang telah dibubuhi sedikit asam benzoat sebagai pengawet.

Endapan hasil presipitasi dimasukkan ke dalam selofan dengan ukuran 12.000 Dalton dan selanjutnya didialisis dengan merendam selofan dalam 100 mL larutan *buffer* fosfat 0,1 M pH 7. Dialisis dilakukan dengan menggunakan magnetik *stirrer* dengan kecepatan 125 rpm, pada suhu 4 °C selama 24 jam dengan penggantian pelarut sebanyak 4 kali. Untuk mengetahui dialisis sudah selesai, larutan *buffer* fosfat 0,1 M pH 7 ditambahkan dengan 1 mL larutan HCl 0,1 M (perbandingan 1:1) dan beberapa tetes BaCl₂. Apabila sudah tidak terbentuk endapan, dialisis dihentikan. Larutan enzim dalam selofan ditentukan berat molekul proteinnya (Bintang, 2010).

SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis*)

a) Persiapan sampel

Protein hasil dialisis (dialisat) yang akan dikarakterisasi dengan menggunakan SDS-PAGE terlebih dahulu dicampurkan dengan *buffer* sampel pada perbandingan 1:1 sebanyak 50 µL. *Buffer* sampel mengandung SDS, merkaptoetanol, gliserol, pewarna protein standar (*bromofenol blue*), tris HCl 1,0 M pH 6,8, dan akuadest. Campuran antara dialisat dengan *buffer* sampel dididihkan di atas penangas air selama 5 menit untuk mereduksi protein agar terdenaturasi, kemudian protein yang terdenaturasi didinginkan pada suhu ruang selama 15 menit sebelum dimasukkan ke dalam sumur gel.

b) Proses pemisahan

Cetakan gel ditempatkan ke dalam kotak gel, kemudian reservoir atas dan bawah diisi dengan *buffer* pemisah. Sebanyak 20 µL protein yang terdenaturasi dimasukkan ke dalam masing-masing sumur (*well*) dengan menggunakan pipet sekali pakai. Pada sumur pertama dimasukkan protein standar, setelah itu elektroforesis dihubungkan dengan arus listrik bertegangan 200 V 400 mA selama 2 jam. Arus listrik dihentikan setelah pewarna protein standar (*bromofenol blue*) mencapai batas akhir 1 cm dari ujung gel bawah dan gel dimasukkan ke dalam wadah yang berisi larutan pewarna (Bintang, 2010).

c) Pewarnaan dan pencucian warna

Pewarnaan dilakukan dengan cara merendam gel dalam larutan pewarna selama 1 jam dengan menggunakan *shaker* pada kecepatan 35 rpm. Setelah proses pewarnaan, gel

dicuci dengan akuades, lalu direndam dalam larutan *destaining*. Larutan pencuci dapat diganti-ganti setiap 12 jam sekali sampai diperoleh gel yang jernih (Bintang, 2010).

d) Perkiraan berat molekul (BM)

Perhitungan berat molekul (BM) dari masing-masing protein dilakukan berdasarkan pada *marker* yang tersedia. Perhitungan dilakukan dengan mengukur jarak migrasi pita protein. Nilai Rf dihitung dengan rumus (Bintang, 2010):

$$Rf = \frac{x_1}{x_2} \dots\dots\dots (1)$$

Keterangan : X_1 = Jarak migrasi protein

X_2 = Jarak migrasi warna

Dari nilai Rf pita protein standar terhadap logaritma berat molekulnya (log BM) dari masing-masing BM pita marker. Setelah kurva standar dibuat, kemudian nilai Rf masing-masing pita diplot terhadap kurva standar untuk menentukan berat molekul pita protein (Bintang, 2010). Dicari Rf dengan membagi jarak masing-masing pita dengan jarak migrasi total (b/a), selanjutnya dihitung log BM dari masing-masing BM pita marker. BM pita polipeptida pada sampel dihitung dengan persamaan linier $\{Y = a \pm bx\}$, nilai log BM sebagai sumbu x dan Rf sebagai sumbu Y.

PEMBAHASAN

Isolasi Enzim Bromelin dan Papain

1. Enzim Bromelin

Ekstrak enzim diisolasi dari kulit buah nanas varietas Bogor dan varietas Subang. Keberadaan enzim bromelin ekstrak nanas di dalam sel bersifat intraseluler atau endoenzim. Sebagai suatu endoenzim, enzim bromelin ekstrak nanas dapat diproduksi melalui isolasi sambung berupa penghancuran kulit buah dan homogenisasi, serta teknik pemisahan melalui sentrifugasi. Penambahan *buffer* fosfat 0,1 M pH 7 pada ekstrak selama pemblenderan bertujuan untuk mempertahankan agar kondisi komponen sel tetap optimum dan tidak mengalami perubahan, setelah itu diamkan selama 24 jam pada suhu 4 °C agar enzim tetap stabil. Sentrifugasi dilakukan untuk mendapatkan supernatan bebas sel sehingga sel akan mengendap karena adanya gaya gravitasi, sedangkan enzim akan tetap berada dalam supernatan (Bintang, 2010). Hasil isolasi bromelin dari kulit buah nanas dapat dilihat pada Tabel 1.

Table 1. Hasil Isolasi Enzim Bromelin dari Kulit Buah Nanas.

Jenis	Varietas Bogor	Varietas Subang
Kulit nanas masak	219,500 g	414,400 g
Sari kulit nanas	300,200 mL	495 mL
Enzim kasar	300 mL	490 mL

2. Enzim Papain

Hampir seluruh bagian tanaman pepaya mengandung enzim papain, namun kandungan tertinggi adalah pada buah yang masih muda berumur 75 - 100 hari atau 2,5 - 3 bulan (Kalie, 2008). Penyadapan dilakukan dengan pisau *stainless steel* agar tidak merusak daya enzimatis papain (Kalie, 2008). Penambahan natrium bisulfit sebanyak 0,7 % dari total getah buah pepaya berfungsi sebagai antioksidan untuk mencegah kerusakan daya enzimatis proteolitik dan getah buah pepaya berbentuk emulsi setelah ditambahkan natrium bisulfit. Hasil penyadapan getah buah papaya dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Penyadapan Getah Buah Pepaya.

Varietas	Jumlah Buah yang Disadap	Berat Getah Buah Pepaya	Umur Buah
California	9 buah	18,240 g	3 bulan
Sukma	5 buah	17,180 g	3 bulan

Presipitasi Protein Enzim Bromelin dan Papain

Presipitasi protein dilakukan dengan menambahkan amonium sulfat merupakan salah satu cara pemurnian protein melalui proses pengendapan garam. Penggunaan amonium sulfat didasarkan pada sifat kelarutannya yang tinggi, tidak merusak struktur protein, dan harganya relatif lebih murah. Beberapa protein berbeda kelarutannya dalam konsentrasi garam yang berbeda, semakin tinggi konsentrasi amonium sulfat maka pengendapan protein semakin baik. Pengendapan dilakukan dengan amonium sulfat pada konsentrasi 60 % dikarenakan pengendapan tertinggi terjadi pada konsentrasi tersebut, hal ini menandakan konsentrasi 60 % mencapai titik isoelektrik protein yang diinginkan. Pengendapan terjadi karena adanya persaingan antara garam dan protein untuk mengikat air (Masri, 2014).

Dialisis

Proses dialisis bertujuan untuk memisahkan protein berdasarkan ukuran molekul protein dengan melewati membran semipermeabel. Molekul yang kecil yaitu garam yang berikatan dengan protein enzim akan melewati pori-pori selaput membran semipermeabel, sehingga molekul yang besar akan tetap tertahan. Konsentrasi di dalam tabung selofan lebih tinggi dibandingkan konsentrasi yang berada di luar tabung selofan, sehingga

terjadinya proses difusi. Membran semipermeabel yang digunakan adalah kantung selofan dengan ukuran pori 12 kDa, sehingga dapat menahan molekul dengan berat molekul lebih dari 12 kDa.

Proses dialisis menggunakan magnetik *stirrer* dengan kecepatan 125 rpm agar pemisahan protein berlangsung homogen, sehingga protein yang lebih kecil akan keluar dari kantung selofan. Endapan hasil presipitasi dimasukkan ke dalam selofan, yang selanjutnya didialisis dengan merendam kantung selofan dalam larutan *buffer* fosfat 0,1 M pH 7. Selama proses berlangsung, suhu pada *buffer* dibuat 4 °C agar menghindari terjadinya kerusakan dan denaturasi protein. Untuk mengetahui protein telah terpisahkan berdasarkan ukuran molekul protein, larutan *buffer* fosfat 0,1 M pH 7 yang berada di luar kantung selofan diuji untuk memastikan tidak adanya lagi senyawa kecil yang keluar dari kantung selofan, dan pengujian dilakukan dengan menggunakan HCl perbandingan 1:1 sebanyak 1 mL dan 3 - 5 tetes BaCl₂ 0,1M. Dialisis dihentikan apabila endapan putih sudah hilang dikarenakan sudah tidak adanya protein dengan ukuran yang lebih kecil keluar dari tabung selofan. Pengukuran hasil dialisis dapat dilihat pada Tabel 3 dan 4.

Tabel 3. Enzim Bromelin Hasil Dialisis.

Varietas Buah Nanas	Hasil Dialisis
Buah nanas varietas Bogor	4,500 mL
Buah nanas varietas Subang	4,800 mL

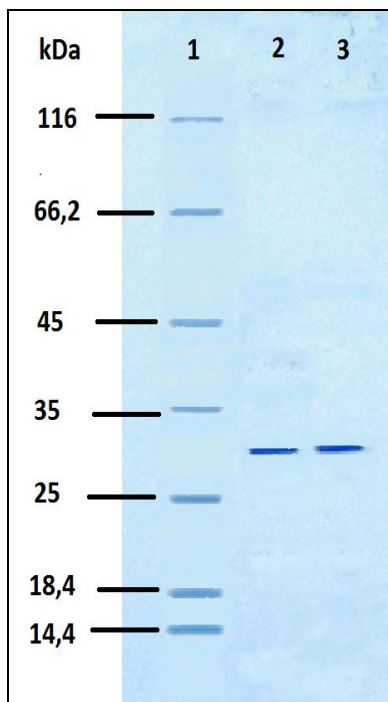
Tabel 4. Enzim Papain Hasil Dialisis.

Varietas	Jumlah Endapan yang Dimasukkan ke dalam Tabung Selofan	Hasil Dialisis
California	3,970 gram	5,200 mL
Sukma	4,040 gram	5,800 mL

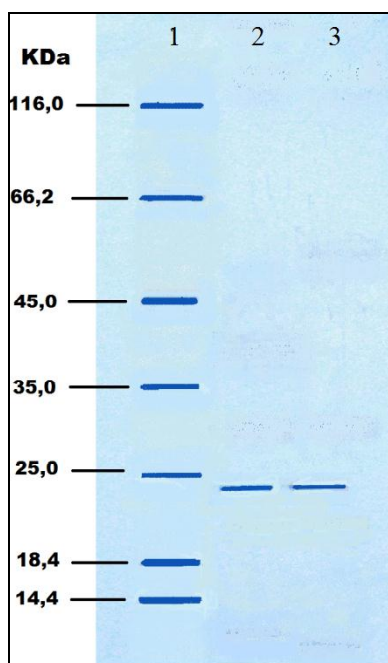
Elektroforesis Gel Poliakrilamida Sodium Dodesil Sulfat (SDS-PAGE)

SDS-PAGE merupakan teknik untuk memisahkan rantai polipeptida pada protein berdasarkan berat molekul yang bermuatan di bawah pengaruh medan listrik (Bintang, 2010). Sebelum dilakukan SDS-PAGE, protein terlebih dahulu diubah dari struktur globular menjadi struktur yang linier dengan proses denaturasi. Gel poliakrilamid merupakan medium yang tepat untuk memisahkan protein berdasarkan ukuran berat molekul karena ukuran pori-pori kecil yang memungkinkan untuk memperlambat gerakan molekul. Analisis dengan SDS-PAGE ini, menggunakan gel poliakrilamid yang terdiri dari *stacking gel* dan *separating gel*. *Stacking gel* terdapat *well* yang berfungsi sebagai tempat

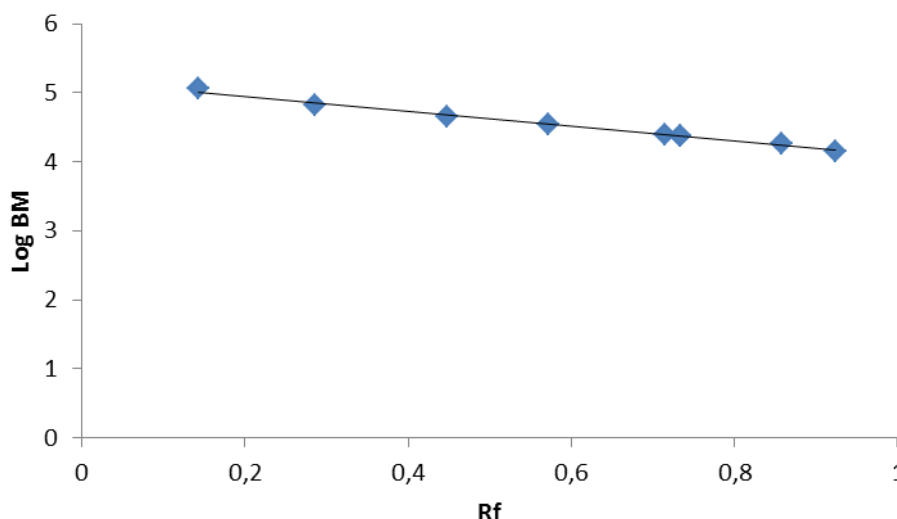
meletakkan sampel sedangkan *separating gel* merupakan tempat protein akan bergerak kearah anoda.



Gambar 1. Elektroforegram SDS PAGE Enzim Bromelin. (1) Marker Protein, (2) Enzim Bromelin Varietas Bogor, dan (3) Enzim Bromelin Varietas Subang.



Gambar 2. Elektroforegram SDS PAGE Enzim Bromelin. (1) *Marker Protein*, dan (2) Enzim Papain Varietas California, (3) Enzim Papain Varietas Sukma.



Gambar 3. Kurva Regresi Linier Berat Molekul *Marker Protein*.

Keterangan : $y = \text{Log Berat Molekul}$, $x = Rf \text{ Marker Protein}$, $a = 5,171$, $b = -1,088$, $r = -0,995$.

Perbedaan dapat dilihat dari konsentrasi gel poliakrilamid yaitu pada *stacking gel* memiliki konsentrasi 5 % sedangkan *separating gel* memiliki konsentrasi 12 %. Semakin kecil berat molekul protein yang dipisahkan, maka semakin tinggi konsentrasi gel poliakrilamid yang digunakan agar pori-pori gel yang terbentuk semakin rapat. Pada saat arus listrik diberikan, molekul bermigrasi melalui gel poliakrilamid dari kutub negatif (katoda) menuju kutub positif (anoda). Elektroforesis dihubungkan dengan arus listrik bertegangan 200 V.

Enzim yang memiliki berat molekul kecil akan bermigrasi lebih cepat dibandingkan yang memiliki berat molekul besar karena berat molekul yang lebih besar akan tertahan sehingga pergerakannya lebih lambat. Elektroforegram hasil SDS PAGE dapat dilihat pada Gambar 1 dan 2.

Berat molekul protein dapat diukur dengan menggunakan *marker protein* yang telah diketahui berat molekulnya, pada penelitian ini *marker protein* yang digunakan yaitu di kisaran 14,4-116 kDa. Perhitungan dilakukan dengan mengukur total jarak migrasi dari *stacking* ke *separating gel* pada *marker*, dilanjutkan dengan mengukur jarak migrasi dari *stacking gel* ke masing-masing pita protein yang terbentuk. Jarak pita dan log bobot molekul *marker protein* untuk kurva standar dapat dilihat pada Gambar 3 dan Tabel 4. Didapatkan hasil 5,171 untuk nilai a , -1,088 untuk nilai b , dan -0,995 untuk nilai r . Dengan diketahui nilai r adalah -0,995 didapatkan hasil kurva yang linier antara nilai log BM dan nilai Rf dengan persamaan garis $y = 5,171 - 1,088x$ sehingga dihasilkan berat molekul enzim bromelin dan papain berbeda varietas yang dapat dilihat pada Tabel 5 dan 6.

Tabel 4. Jarak Pita dan Log Bobot Molekul *Marker Protein*.

Berat Molekul	Log berat molekul	Cm	Rf
116000	5,064	1,500	0,143
66200	4,821	3	0,286
45000	4,653	4,700	0,448
35000	4,544	6	0,571
25000	4,398	7,500	0,714
18400	4,265	9	0,857
14400	4,158	9,700	0,924

Tabel 5. Berat Molekul Enzim Bromelin.

Enzim Bromelin	Berat Molekul
Varietas Bogor	30,654 kDa
Varietas Sukma	30,654 kDa

Tabel 6. Berat Molekul Enzim Papain.

Enzim Papain	Berat Molekul
Varietas California	23,485 kDa
Varietas Sukma	23,485 kDa

Berdasarkan Tabel 5, perbedaan varietas enzim bromelin dinyatakan tidak ada perbedaan berat molekul disebabkan karena pengambilan buah nanas pada dua varietas sama-sama didataran tinggi dan umur buah nanas yang sama sehingga kemungkinan tidak terjadi perbedaan berat molekul pada enzim bromelin dengan perbedaan varietas. Perbedaan varietas enzim papain dinyatakan tidak ada perbedaan berat molekul yang dapat disebabkan karena penyadapan getah buah pepaya dua varietas di dataran yang sama dengan unsur hara yang sama juga umur buah yang sama sehingga kemungkinan tidak terjadi perbedaan berat molekul enzim papain (Tabel 6).

Pita yang didapat dari hasil SDS-PAGE ini menunjukkan pita yang tipis, diduga karena konsentrasi protein pada rentang sangat rendah dan konsentrasi berpengaruh pada ketebalan pita protein pada hasil SDS-PAGE. Tebal tipisnya pita protein yang terbentuk pada hasil SDS-PAGE menunjukkan kandungan atau banyaknya protein yang mempunyai berat molekul yang sama, yang berada pada posisi pita yang sama. Hal ini sesuai dengan prinsip pergerakan molekul bermuatan yaitu molekul bermuatan dapat bergerak bebas di bawah pengaruh medan listrik. Molekul dengan muatan dan ukuran yang sama akan terakumulasi pada zona atau pita yang sama atau berdekatan (Asadayanti, 2010).

KESIMPULAN

Berat molekul enzim bromelin dengan varietas Bogor dan varietas Suka memiliki hasil yang sama yaitu 30,654 kDa. Berat molekul enzim papain dengan varietas California dan varietas Sukma memiliki hasil yang sama yaitu 23,485 kDa. Dapat disimpulkan

varietas buah yang berbeda tidak berpengaruh terhadap profil berat molekul enzim bromelin dan papain.

DAFTAR PUSTAKA

- Asadayanti, D.D, Jenie, B.S. L., Kusumaningrumi, H. D dan Nurhidayat, N., 2010. Peningkatan Kadar Lovastatin Angkak oleh *Monascus purpureus* Ko-Kultur dengan *Endomycopsis burtonii*. *Berita Biologi Jurnal Ilmu-ilmu Hayati* 10 (3), 313-321.
- Bachrudin, Z., Astuti, and Dewi, Y.S., 2000. Isolasi dan Seleksi Mikroba Penghasil Laktat dan Aplikasinya pada Fermentasi Limbah Industri Tahu. *Prosiding Seminar Nasional Industri Enzim dan Bioteknologi*. Mikrobiologi Enzim dan Bioteknologi.
- Bintang, M., 2010. *Biokimia Teknik Penelitian*. Erlangga. Jakarta.
- BioRad Laboratories, 2011. *A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection*. Life Science Group. US/EG.
- Gautam, S., Mishra, S.K., Dash, V., Goyal, A.K., and Rath, G., 2010. Comparative Study of Extraction, Purification and Estimation of Bromelain from Stem and Fruit of Pineapple Plant. *Thailand Journal Pharmacy*. 34: 67-76.
- Hadiati, S., and Luh, P.I.N., 2008. *Budidaya Nanas*. Balai Penelitian Tanaman Buah Tropika. Sumatera Barat.
- Handayani, L., 2007. *Uji Aktivitas Anti tuberculosis Ekstrak Getah Pepaya (Carica papaya L.) terhadap Bakteri Mycobacterium tuberculosis H37Rv*. Skripsi. Fakultas Farmasi dan Sains Universitas Muhammadiyah Prof. Dr. Hamka. Jakarta.
- Herdyastuti, N., 2006. Isolasi dan Karakterisasi Ekstrak Kasar Enzim Bromelin dari Batang Nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr). *Berkala Penelitian Hayati* 12, 75-77.
- Jisha, V.N., Smitha, R.B., Pradeep, S., Sreedevi, S., Unni, K.N., Sajith, S., Priji, P., Josh, M.S., and Benjamin, S., 2013. Versatility of Microbial Protease. *Advances in Enzyme Research* 1 (3), 39-51.
- Kalie, M.B., 2008. *Bertanam Pepaya*. Penebar Swadaya. Depok. 92-106.
- Kuchel, P., and Ralston, G.B., 2006. *Schaum's Easy Outlines Biokimia*, Terjemahan: Eva Laelasari, S.Si. Erlangga, Jakarta. 49-50.
- Kusumadjaja, P.A., and Dewi, P.R., 2005. Penentuan Kondisi Optimum Enzim Papain dari Pepaya Burung Varietas Jawa. *Indonesia Journal of Chemistry* 5 (2), 147-148.
- Masri, M., 2014. Isolasi dan Pengukuran Aktivitas Enzim Bromelin dari Ekstrak Kasar Bongol Nanas (*Ananas comosus*) pada Variasi Suhu dan pH. *Jurnal Ilmiah Biologi* 2 (2), 119-125.
- Motyan, J.A., Toth, F., and Tozser, J., 2013. Research Applications of Proteolytic Enzyme in Molecular Biology. *Biomolecules review* 3 (1), 925 - 931.
- Nitsawang, S., Kaul, R.H., and Kanasawud, P., 2006. Purification of Papain from *Carica papaya* Latex : Aqueous Two-Phase Extraction versus Two-Step Salt Precipitation. *Enzyme and Microbial Technology* 39 (6), 1103-1107.

- Nurhidayati, T. 2003. Pengaruh Konsentrasi Enzim Papain dan Suhu Fermentasi terhadap Kualitas Keju Cottage. *Kappa* 4 (1), 13-17
- Nurmala, L.W., 2012. *Kajian Penggunaan Ammonium Sulfat Pada Pengendapan Enzim Bromelin dari Batang Nanas (Ananas comosus L. Merr) Sebagai Koagulan pada Pembuatan Keju Cottage*. Skripsi. Universitas Pendidikan Indonesia. Bandung.
- Pitpreecha, S., and Damrongsakkul, S., 2006. Hydrolysis of Raw Hide using Proteolytic Enzyme Extracted from Papaya Latex. *Korean Journal of Chemical Engineering* 23 (6), 972-976.
- Putri R.A., Kusrijadi, A., and Suryatna, A., 2013. Kajian Penggunaan Ammonium Sulfat pada Pengendapan Enzim Protease (Papain) dari Buah Pepaya sebagai Koagulan dalam Produksi Keju Cottage. *Jurnal Sains dan Teknologi Kimia* 4 (2), 159-168.
- Rao, M.B., Tanksale, M.A., Ghatge, M.S., and Deshpande, V.V., 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62 (3), 599-601, 606-607.
- Rath, A., Cunningham, F., and Deber, C.M., 2013. Acrylamide Concentration Determines the Direction and Magnitude of Helical Membrane Protein Gel Shifts. *Proceeding of the National Academy Science* 110 (39) 15668-15673.
- Sobir, 2009. *Sukses Bertanam Pepaya Unggul Kualitas Supermarket*. AgroMedia. Jakarta. 26-29, 146-147.
- Wuryanti, 2004. Isolasi dan Penentuan Aktivitas Spesifik Enzim Bromelin dari Buah Nanas (*Ananas comosus L.*). *Jurnal kimia Sains dan Aplikasi* 3 (7), 83-87.